

**EIN VERGLEICH VERSCHIEDENER METHODEN
ZUR TRENNUNG
DER ZELLULÄREN BLUTBESTANDTEILE
BEI SCHWEIN UND RIND**

Maria Schmidt

1974



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551921_0088

Aus dem Institut für Mikrobiologie und
Infektionskrankheiten der Tiere der
Tierärztlichen Fakultät der Universität München
(Vorstand: Prof. Dr. Dr. h. c. A. MAYR)
Abteilung für Immunbiologie
(Abteilungsleiter: Priv. Doz. Dr. H. Buschmann)

EIN VERGLEICH VERSCHIEDENER METHODEN
ZUR TRENNUNG DER ZELLULÄREN BLUTBESTANDTEILE
BEI SCHWEIN UND RIND

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der
Tierärztlichen Fakultät
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Maria Schmidt
aus
Gunzenhausen

München 1974

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen

Fakultät der Universität München

Dekan: Prof. Dr. E. Dahme

Referent: Priv. Doz. Dr. G.H. Buschmann

Korreferent: Prof. Dr. H. Kraft

Tag der Promotion: 26. Juli 1974



Meinen lieben Eltern

in Dankbarkeit gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. EINLEITUNG	1
B. SCHRIFTUM	
1. Begriffsbestimmung; Eigenschaften und Funktion der zellulären Blutbestandteile im physiologischen Geschehen	2
2. Bedeutung der zellulären Blutbestandteile im immunologischen Geschehen	
2.1. Phagozytierende Zellen des Körpers	9
2.2. Rolle der Blutzellen bei der Beseitigung von Bakterien	10
2.3. Antikörperbildende Zellen	11
2.4. Rolle der Lymphozyten als immunologisch kompetente Zellen	13
3. Verschiedene Verfahren zur Trennung der einzelnen zellulären Blutbestandteile	
3.1. Sedimentationsverfahren	15
3.2. Flotationsverfahren	18
3.3. Säulenverfahren	24
3.4. Gradientenverfahren	27
C. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	
1. Leukozytenisolierung aus Schweine- und Kälberblut nach dem Flotationsverfahren mit Jodamid	
1.1. Material und Methode	30
1.2. Gesamtzellzahlbestimmung	35
1.3. Differentialblutbild	36

	Seite
1.4. Vitalitätstest	37
1.5. Phagozytotest	37
1.6. ^{14}C -Glukosetest zur Phagozytoseaktivitäts- bestimmung	38
2. Leukozytenisolierung aus Schweine- und Kälberblut mittels Nylonfasersäule	
2.1. Material und Methode	40
2.2. Gesamtzellzahlbestimmung	43
2.3. Differentialblutbild	45
2.4. Vitalitätstest	47
2.5. Phagozytotest	47
2.6. ^{14}C -Glukosetest zur Phagozytoseaktivitäts- bestimmung	47
3. Leukozytenisolierung aus Schweine- und Kälberblut mittels Ficoll-Isopaque	
3.1. Material und Methode	49
3.2. Gesamtzellzahlbestimmung	51
3.3. Differentialblutbild	51
3.4. ^{14}C -Glukosetest zur Phagozytoseaktivitäts- bestimmung	53
4. Lymphozytenisolierung aus Schweine- und Kälberblut durch Zentrifugation in einem Ficoll-Isopaque-Medium	
4.1. Material und Methode	55
4.2. Gesamtzellzahlbestimmung	56
4.3. Differentialblutbild	56
4.4. Vitalitätstest	56

	Seite
5. Leukozytenisolierung aus Schweine- und Kälberblut mittels eines Ficollldichte- gradienten	
5.1. Material und Methode	58
5.2. Differentialblutbild	59
D. DISKUSSION	60
E. ZUSAMMENFASSUNG	63
F. LITERATURVERZEICHNIS	65
LEBENS LAUF	

A. EINLEITUNG

Die Isolierung der einzelnen zellulären Bestandteile aus dem Blut gewinnt immer mehr an Bedeutung für hämatologische, immunologische und cytogenetische Untersuchungen. Nach Einwirkung eines Mitogens können Zellen aus reinen Lymphozytenfraktionen im Mitosestadium gewonnen werden, die sich für Chromosomenanalysen eignen. Da den Lymphozyten bei der Abstoßung von Transplantaten große Bedeutung zukommt, bietet die serologische Typisierung von Lymphozyten eine gute Möglichkeit die Antigendifferenzen bei Spender- und Empfängerzellen zu testen. Durch die Auswahl kompatibler Spender kann die Überlebenszeit von Transplantaten verlängert werden.

Ebenso von praktischer Bedeutung sind reine Erythrozytensuspensionen. Sie spielen bei der Bluttransfusion eine Rolle, da in reinen Erythrozytensuspensionen keine immunkompetenten Zellen mehr vorhanden sind, die eine Unverträglichkeitsreaktion hervorrufen könnten.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, verschiedene Methoden zur Trennung der zellulären Bestandteile aus Schweine- und Kälberblut durchzuführen und miteinander zu vergleichen.

B. SCHRIFTUM

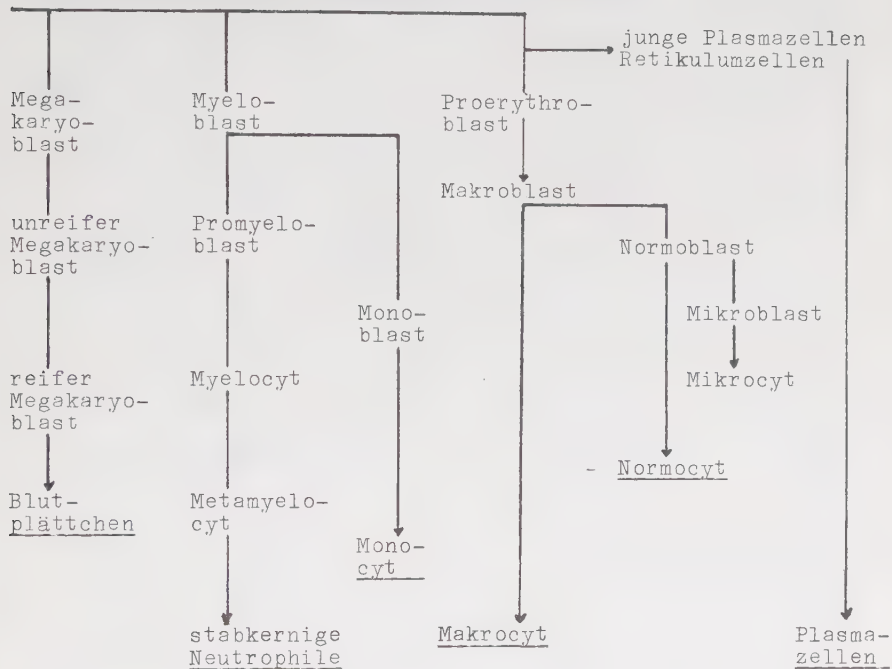
1. Begriffsbestimmung; Eigenschaft und Funktion der zellulären Blutbestandteile im immunologischen Geschehen

Die Blutzusammensetzung ist für viele Vorgänge im Organismus von großer Bedeutung. Neben Transportfunktionen und Ernährungsfunktionen ist das Blut bevorzugt Träger von Abwehrleistungen.

Blutbestandteile sind das Plasma, das etwa 56 % des Blutvolumens ausmacht und die zellulären Bestandteile wie Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten, die etwa 44 % des Gesamtblutes ergeben. Das Muttergewebe aller im Blut kreisenden Zellen ist das embryonale Mesenchym, aus dem später das RES wird. Aus undifferenzierten Retikulumzellen differenzieren sich die weißen und die roten Blutzellen.

Das Schema zeigt die Zellbildung und Zellreifung nach ROHR auf (zitiert nach HALLMANN, 1966).

undifferenzierte Retikulumzelle



Erythrozyten werden im Mark der kurzen Knochen als farbstofflose, kernhaltige Stammzellen gebildet und nach Farbstoffeinlagerung und Kernauflösung in das Blut abgegeben. Zelluntergang und Neubildung wechseln ununterbrochen einander ab. Dem Hämoglobin, dem roten Blutfarbstoff, obliegt als Hauptaufgabe der Sauerstofftransport.

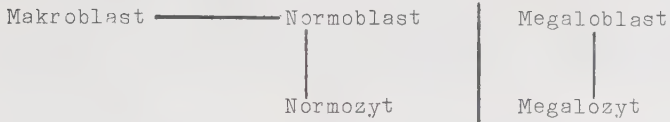
Über die Entstehung der Leukozyten herrschen recht verschiedenartige Auffassungen. Nach der unitarischen Vorstellung (Hauptvertreter MAXIMOW) glaubt man an die Abstammung aller Leukozyten von zunächst undifferenzierten, im mesenchymalen Retikulum entstehenden Stammzellen, deren Steuerung sich in spezifisch myeloischer, lymphatischer oder monozytärer Richtung unter dem Einfluß bestimmter Reize vollzieht. Die Dualisten hingegen bevorzugen eine Zweiteilung. Sie ordnen alle weißen Zellen in zwei Hauptgruppen, nämlich in eine myeloische und eine lymphatische Reihe, wobei allerdings die Zugehörigkeit der mononukleären Übergangsformen zu der einen oder anderen Gruppe noch verschieden beurteilt wird. Schließlich vertritt SCHILLING die trialistische Auffassung, die den Streit um die fragliche Zugehörigkeit der Monozyten damit zu beenden sucht, daß diesen Zellen eine selbständige Stellung als gleichwertiger dritter Zellstamm neben der myeloischen und lymphatischen Gruppe eingeräumt wird (HALLMANN, 1966).

Für die praktische Blutdiagnostik jedoch sind die verschiedenen Anschauungen über die Abstammung und Entwicklung ohne Belang. Es ist jedenfalls sicher, daß alle Blutzellen vor

ihrer Einwanderung in das Blut normalerweise einen bestimmten Reifungsprozeß durchmachen.

Die beiden folgenden Schemata zeigen den Vorgang bei der Erythropoese und Leukopoese (HALLMANN, 1966).

Erythropoese



Leukopoese

Myeloische Gruppe	Lymphatische Gruppe	Retikuloendotheliale Gruppe	
pölymorphkernige L.	Lymphozyten	Monozyten	Plasmazyten
polynukleäre L.			
Granulozyten oder Neutrophile			
Myeloblast — Promyelozyt	Lymphoblast	Mono-blast	Lympho-blast
			Plasma-zelle
Myelozyt unreif	eosinc-phil. basophil. junger Lymphozyt	junger Monozyt	junge Plasma-zelle
Myelozyt reif			
Mela-meyelozyt	großer Lymphozyt		
jugendl. Neutrophil			
stabkernig. Neutrophil.			
segmentkernig. Neutrophil.	kleiner Lymphozyt	älterer Monozyt	reife Plasma-zelle

Unter pathologischen Verhältnissen kann der Entwicklungsvorgang hinsichtlich der Erythropoese als auch der Leukopoese gestört sein, sodaß es zu einer Verschiebung des relativen Verhältnisses der Zellarten untereinander kommt. Der Organismus reagiert auf infektiöse und toxische Schädigungen und beeinflusst typisch den Charakter des weißen Blutbildes. Den Leukozyten fällt eine wichtige Funktion bei Abwehrmaßnahmen des Körpers zu.

Der Abwehrvorgang bei einer normalen Infektion läuft in 3 Phasen ab.:

1. die neutrophile Kampfphase mit starker Vermehrung der Neutrophilen
2. die monozytäre Abwehr oder Überwindungsphase mit starkem Rückgang der Zahl der Leukozyten und starker Vermehrung der Monozyten
3. die eosinophile- lymphozytäre Heilphase, die durch Lymphozytose und Eosinophilie gekennzeichnet ist.

Die Thrombozyten schließlich als dritte Formbestandteile des Blutes spielen in der Hauptsache eine Rolle bei der Blutgerinnung.

Aus Untersuchungen mit Tierblut stammen die folgenden Angaben in Tabelle 1.

Tabelle 1 zeigt die Leukozytennormalwerte bei Schwein und Rind. Beim Schweineblut ist die Gesamtzellzahl der Leukozyten pro mm³ in verschiedenen Lebensaltern unterschiedlich, während sie beim Rinderblut konstant bleibt. Auch das Erythrozyten- Leukozytenverhältnis ist im Schweine-

und Rinderblut unterschiedlich. Beim Schweineblut entfallen 400 Erythrozyten auf 1 Leukozyten, beim Rinderblut 800 Erythrozyten auf 1 Leukozyten (SWENSON, 1970).

Tabelle 1: Leukozytennormalwerte im Schweine- und Rinderblut

	Gesamtzellzahl	Neutrophile	Lymphozyten	Monozyten	Eosinoph.	Basophile
Schwein	15.000 - 22.000	30 - 35	55 - 60	5 - 6	2 - 4	1
Ferkel	7.500 - 11.000					
Rind	7.000 - 10.000	25 - 30	60 - 65	5	2 - 5	1
Kalb	7.000 - 10.000					

2. Die Bedeutung der zellulären Blutbestandteile im immunologischen Geschehen

2.1. Phagozytierende Zellen des Körpers

Um dem Eindringen parasitärer Mikroorganismen zu begegnen, verfügt der Körper über verschiedene Formen der zellulären Abwehr. Ihre Abwehrfunktion verläuft in folgenden 3 Stufen:

1. die lokale Entzündungsantwort (Gebiet der primären zellulären Abwehrstellung)
2. die lymphatische Abwehrschanke
3. die zelluläre Abwehr im Blutstrom

Als Verteidiger gegen eine Infektion sind die Phagozyten an jeder der drei Stufen beteiligt. Die Kenntnis der Lage phagozytierender Zellen in den verschiedenen Geweben des Körpers folgt den Beobachtungen von RIBBERT (1904), daß Lithiumkarmin nach der Infektion von bestimmten Zellen aufgenommen wird. Bei diesen Zellen konnte eine Speicherung von Vitalfarbstoffen nachgewiesen werden (HUMPHREY und WHITE, 1972).

Die Phagozyten werden eingeteilt in Makrophagen zu denen die Histiozyten des Bindegewebes, die Monozyten des Blutes, die Mikroglia des ZNS, die Sinuswandzellen von Milz, Leber, Nebennieren, Knochenmark, Hypophysenvorderlappen sowie die Retikulumzellen von lymphatischem Gewebe der Milz, Lymphknoten, Knochenmark und Thymus gehören und in Mikrophagen.

Dazu gehören die polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten und die eosinophilen Leukozyten (HUMPHREY und WHITE, 1972).

Es besteht eine gegenseitige Beziehung zwischen den mononukleären Phagozyten des Gewebes, des peripheren Blutes und des Knochenmarks. Unter mononukleären Phagozyten werden solche mononukleären Zellen verstanden, die an Glas anhaften und phagozytieren können (FURTH und COHN, 1968). Gewebsmakrophagen scheinen von den Monozyten abzustammen. Die Monozyten leiten sich aus Zellen des Knochenmarks, den Promonozyten ab. Die Möglichkeit, daß andere Organe eine Quelle für Monozyten darstellen, konnte an Hand von Splenektomie und Versuchen mit Röntgenbestrahlung ausgeschlossen werden. Die Promonozyten proliferieren und differenzieren im Knochenmark, bevor sie in den Blutkreislauf eintreten. Die Monozyten wandern aus dem peripheren Blut in die Gewebe ein und differenzieren zu Makrophagen. Es gibt keine Anhaltspunkte dafür, daß die mononukleären Phagozyten von den Lymphozyten abstammen (FURTH und COHN, 1968).

2.2. Rolle der Blutzellen bei der Beseitigung von Bakterien

Bei der Beseitigung und Vernichtung von Bakterien, nicht-mikrobiellen Fremdstoffen und Zelltrümmern aus dem Blutstrom oder der Lymphe spielen neben den Makrophagen die polymorphkernigen Leukozyten eine wesentliche Rolle. Die aus dem Blutstrom ausgewanderten polymorphkernigen Leukozyten nehmen aufgrund ihrer Fähigkeit zu phagozytieren die Bakterien auf und bewirken ihre Auflösung mittels proteolytischer Fermente. Eine Ausnahme bilden die mit

einer Kapsel versehenen virulenten Stämme von *Diplococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* und *Bacillus anthracis*, die einer Phagozytose widerstehen können. Zu einer wirksamen Beseitigung solcher bekapselter Mikroorganismen sind Serumfaktoren wie Antikörper und Komplement erforderlich (HUMPHREY und WHITE, 1972).

Von polymorphernigen mit Bakterien beladenen Leukozyten, die besonders in den Kapillaren der Lunge zu finden sind, wird angenommen, daß sie von den Makrophagen des reticuloendothelialen Systems aufgenommen und beseitigt werden.

2.3. Antikörperbildende Zellen

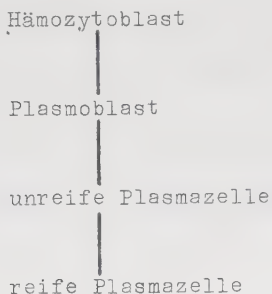
Früher wurde angenommen, daß die Zellen, die das Immunogen aufnehmen, auch Antikörper bilden. Die Ansicht, daß große Makrophagen Antikörper synthetisieren, konnte nicht bestätigt werden, obwohl Makrophagen im allgemeinen große Mengen Antigen enthalten und gewisse Antigene noch sehr lange in Makrophagen nachgewiesen werden können (KABAT, 1971).

Trotzdem ist der Vorgang der Aufnahme des Immunogens, die Aufbewahrung und der Abbau durch die Zellen des RES von Bedeutung für die Immunantwort. Bei der Bildung von Antikörpern sind Milz, Knochenmark, Lunge und Lymphknoten wichtige antikörperbildende Organe. Der Thymus und die Bursa Fabricii der Vögel nehmen unter den lymphatischen Geweben eine besondere Stellung ein. Von ihnen werden Zellen für die Besiedelung anderer lymphatischer Organe bereitgestellt oder sie regulieren durch Produktion von Hormonen deren Entwicklung.

Die Rolle der Makrophagen bei der Antikörperbildung ist noch nicht klar. In histologischen Untersuchungen konnte immer ein Zusammenhang zwischen der Anwesenheit von Makrophagen, die das Antigen phagozytiert haben und der Antikörperbildung gesehen werden. Es wird vermutet, daß der Makrophage das Antigen katabolisiert und durch diese Funktion die antikörperproduzierenden Zellen vor zu exzessivem Kontakt mit dem Antigen schützt, der sonst zur Paralyse führen würde (HUMPHREY und WHITE, 1972).

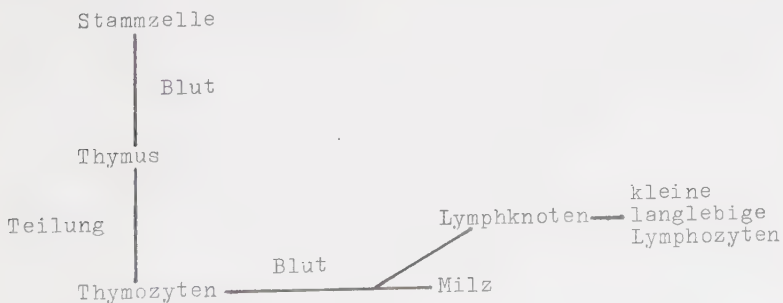
Die größte Bedeutung bei der Bildung von Antikörpern kommt der reifen Plasmazelle zu. Zellen, die an der Bildung von Antikörpern beteiligt sind, durchlaufen eine Reihe von Differenzierungsprozessen. Unreife Zellen sind basophil, d. h. sie lassen sich infolge der Anwesenheit von Ribonukleinsäure im Zytoplasma mit gewissen basischen Farbstoffen anfärben. Diese Eigenschaften stehen mit der aktiven Synthese von Protein im Zusammenhang. Die meisten weißen Blutzellen verlieren während ihres Reifungsprozesses die basophilen Färbereigenschaften, während die Plasmazellen diese Eigenschaft auch in reifem Zustand beibehalten (KABAT, 1971).

Die Differenzierung aus primitiven Retikulumzellen zur reifen Plasmazelle nach Antigeninjektion verläuft wie folgt:



2.4. Rolle der Lymphozyten als immunologisch kompetente Zellen

Als immunologisch kompetente Zellen spielen die kleinen Lymphozyten eine entscheidende Rolle. Im unten angegebenen Schema ist die Entwicklung der kleinen Lymphozyten aufgezeigt (zitiert nach HUMPHREY und WHITE, 1972).



Die kleinen Lymphozyten sind nötig, damit eine Antikörperantwort entsteht und zwar eine Erstantwort.

Als "Gedächtniszellen" ("memory" cells) sind sie für eine beschleunigte Sekundärantwort zuständig, die einem späteren Kontakt mit dem Immunogen folgt.

Für die zellvermittelten spezifischen Immunreaktionen wie Transplantatabstoßung und Überempfindlichkeit vom verzögerten Typ sind ebenfalls die kleinen Lymphozyten zuständig.

3. Verschiedene Verfahren zur Trennung einzelner Zellfraktionen

3.1. Sedimentationsverfahren

Viele Verfahren zur Trennung von Leukozyten aus dem Vollblut beruhen auf einer Beschleunigung der Erythrozytensedimentationsrate. Dabei werden Substanzen verwendet, die die Sedimentationsrate der Erythrozyten ansteigen lassen. LI und OSGOOD (1949) beschreiben eine technisch einfache und schnelle Methode zur Trennung von Erythrozyten und Leukozyten, indem sie die Erythrozytenagglutination durch Zugabe von Phytohämagglutinin, einem nicht toxischen Hämagglutinin aus *Phaseolus vulgaris*, beschleunigen. Sie isolieren die Leukozyten aus Blut oder Knochenmark. Nach leichter Zentrifugation wird der Überstand mit den kernhaltigen Zellen abpipettiert. Diese Trennung ist innerhalb von 10 Min. für Blutvolumina von weniger als 1 ml bis über 500 ml durchführbar.

Die Zellen bleiben im eigenen Plasma suspendiert und sind zählbar. Die Motilität, Morphologie und Lebensdauer der isolierten Zellen in Kulturen ist nicht verändert. Neben Phytohämagglutinin wird auch Fibrinogen und Dextran zur raschen Sedimentation benutzt. SKOOG und BECK (1956) haben festgestellt, daß mit 3%igem Dextran (MG 229.000) in einem 2:1 Dextranblutgemisch die höchste Sedimentationsrate und gute Lymphozytentrennung erzielt werden. Bei Anwendung von Fibrinogen erbringt diese Methode höhere Leukozytenergebnisse in kürzerer Zeit, wobei Fibrinogen im Gegensatz zu Dextran temperaturabhängig ist und

bei 0 Grad C nicht anwendbar ist. Im Gegensatz zu LI und OSGOOD betrachten SKOOG und BECK (1954) eine Sedimentation mit Phytohämagglutinin für die Leukozytenisolierung als ungeeignet, da die Erythrozyten nicht in Geldrollenform agglutiniert sind. FALLON u. a. (1962) fanden bei Leukozyten, isoliert nach Dextransedimentation der Erythrozyten, volle Lebensfähigkeit und keine Veränderung in der Zellatmung und der Glykolyse bei normalen als auch leukämischen Zellpräparationen.

Während die vorhergehenden Methoden sich mit der Leukozytenisolierung beschäftigen, beschreibt JAGO (1956) eine kombinierte Zentrifugations- und Sedimentationsmethode zur Trennung von Lymphozyten aus Menschenblut, die auf verschiedenen Dichten der Granulozyten und Lymphozyten basiert. Venöses Blut wird mit Heparin gemischt und zentrifugiert. Die Lymphozyten in der obersten Schicht des Überstandes werden abgezogen und nach 30 Minuten Sedimentierung bei 37 Grad C, wird der endgültige Überstand als Lymphozytensuspension mit Plasma gemischt. Mit dieser Methode kann eine Isolierung von lebensfähigen und morphologisch unveränderten Zellen aus dem Blut erreicht werden. Die Verunreinigung mit Erythrozyten ist hierbei gering. Bei der Isolierung von Leukozyten ist eine möglichst geringe Kontamination mit Erythrozyten anzustreben, um lebensfähige Zellen zu gewinnen.

CHRISTLIEB u. a. (1962) beschreiben eine Methode zur Isolierung von gereinigten lebensfähigen Leukozytenpräparationen, wobei die Lebensfähigkeit, die Phagocytosefähigkeit und das morphologische Erscheinungsbild der Zellen

voll erhalten bleiben. Die Erythrozytenkontamination beträgt weniger als 0,1 %. Heparinblut wird mit 20 %iger Dextranlösung vermischt. Bei 4 Grad C in 30 Min. ist der größte Teil der Erythrozyten sedimentiert. Nach Waschen der Zellen in gepufferten Salzlösung wird nochmals zentrifugiert und der Überstand verworfen. Mit Hilfe eines Teflon-Kolbens des Homogenisators werden Erythrozyten, die noch mit den Leukozyten verklumpt sind, abgetrennt. Nach Übertragung der Zellsuspension in ein enges Zentrifugenröhrchen setzen sich die Leukozyten ab, indem nur die veränderten Erythrozyten im Überstand zurückbleiben. Nach Entfernung des Überstandes erhält man die erwünschten Zellsuspensionen.

3.2. Flotationsverfahren

Die Flotation ist ein Trennverfahren zur Isolierung weißer Blutzellen verschiedenen Typs und unterschiedlichen spezifischen Gewichtes durch Zentrifugation des Blutes gegen eine blutverträgliche Flüssigkeit mit hoher Dichte. In diesem Trennungsverfahren wurde Rinderalbumin, Gelatine, Ficoll, Isopaque und Jodamid (Uromiro) verwendet. Dadurch wurden Leukozyten, Lymphozyten und Granulozyten von den übrigen zellulären Blutbestandteilen getrennt.

AGRANOFF und VALLEE (1952) isolierten polymorphkernige Leukozyten und Lymphozyten aus Blut des Menschen auf Grund ihres unterschiedlichen spezifischen Gewichtes mit Hilfe von Albuminlösungen unterschiedlicher Dichten und anschließender Zentrifugation. Die Blutproben wurden auf 2 isosmotische Albuminlösungen gelagert, wobei Lösung I eine geringere Dichte als Lösung II aufwies. Nach Zentrifugation befinden sich die Lymphozyten als Zellen mit niedrigerer Dichte an der Plasma- Albumintrennfläche und die polymorphkernigen Leukozyten an der Trennschicht zwischen Lösung I und Lösung II. Die Erythrozyten waren am Boden sedimentiert. Diese Methode erbrachte 90% reine Zellen. SPRIGGS und Mitarbeiter (1960) verwendeten eine Albuminlösung zur Isolierung von Tumorzellen aus dem zirkulierenden Blut. Durch Zugabe von Dextran wird die Erythrozytensedimentation beschleunigt. Der Überstand mit den weißen Blutzellen wird entfernt und zentrifugiert. Die Leukozytensuspension wird auf eine Säule aus Rinderalbumin und Plasma gebracht und zentrifugiert, wodurch ver-

schiedene Schichten entstehen. Die oberste Schicht mit Monozyten und einigen Lymphozyten, die mittlere Schicht mit den polymorphkernigen Leukozyten und in der untersten Schicht die Erythrozyten. Tumorzellen sind in der obersten Schicht zu finden.

BENNETT und COHN (1966) erzielen eine quantitative Gewinnung von Monozyten aus Pferdeblut mittels Flotation auf einer dichten Albuminlösung.

Aufgrund der niedrigen Dichte der Monozyten, verglichen mit den anderen Blutleukozyten, wird eine Konzentrierung der Monozyten zusammen mit einer verschiedenen Anzahl von Lymphozyten gleicher Dichte auf der Oberfläche durch das Flotationsverfahren bewirkt.

Bei Anwendung des Flotationsverfahrens mit Albumin konnten AHRONS u. a. (1968) eine schnelle Präparation von Lymphozytensuspensionen erzielen, die für Tests zur Gewebebestimmung bei Transplantationen ausreicht.

Zelltrümmer und geschädigte Zellen, die bei Isolierung der Zellen mittels Dichtezentrifugation oder beschleunigter Sedimentation entstehen, fördern eine Zellverklumpung. Bei ihrem Vorhandensein in Zellgewebeskulturen wird eine Reduzierung der Immunantwort beobachtet. Geschädigte Zellen binden Antigene nicht spezifisch, daher sind sie bei Versuchen, die an Lymphozyten durchgeführt werden, die eine spezifische Bindung an ein bestimmtes Antigen haben, unerwünscht. SHORTMAN u. a. (1970) beschreiben eine Methode um Zelltrümmer und Erythrozyten aus lymphoiden Zellsuspensionen zu entfernen.

sionen zu entfernen. Die Zellsuspensionen werden in 10 %igem foetalem Kälberserum für 5 bis 15 Min. zur Sedimentation der großen Zelltrümmer stehengelassen. Die Serumschicht mit Zellen und feinen Zelltrümmern wird auf eine 100 %ige Serumschicht gelagert und zentrifugiert. Nach Entfernung des 10 %igen und 100 %igen Serumüberstandes ist der Zellknopf frei von feinen Zelltrümmern. Die Zellausbeute liegt dabei um 10 % höher als bei den herkömmlichen Sedimentations- und Zentrifugationsmethoden. Um die nicht verklumpten geschädigten Zellen zu isolieren wurde der Zellknopf in ein Albumindichtemedium verteilt. Nach Zentrifugation sedimentierten die dichten Zelltrümmer. 90 % intakte Zellen konnten aus dem Überstand wiedergewonnen werden, im Gegensatz zur Säulentrennung mit 80 %. Eine bessere Immunreaktion der von Zelltrümmern gereinigten Zellsuspensionen konnte beobachtet werden. Diese Methode ist einfach, um Zellen unterhalb und oberhalb einer bestimmten Dichte zu selektieren. Die Verwendung von Gelatinelösung als Trennmedium zur Isolierung von Lymphozyten aus Menschenblut bringt 100 %ige Lebensfähigkeit der Zellen und die volle Erhaltung ihrer Motilität (COULSON und CHALMERS, 1964). Um sowohl relativ reine Lymphozyten- als auch Granulozytenfraktionen aus ein und derselben Blutprobe zu erhalten, haben MELEN und UNGER (1967) die Gelatinemethode modifiziert, in-dem sie die untere der 2 Schichten mit einer isotonischen Salzlösung mischten und 6 %iges Dextran hinzufügten. Der Überstand nach der Sedimentierung enthält bis 90 % Granulozyten. Eine Flotationsmethode mit Ficoll als Medium ist von NOBLE und CUTTS (1968) beschrieben.

Ficoll, ein synthetisches Polymer aus Saccharose und Epichlorhydrin mit hohem Molekulargewicht wirkt auf das Zellsystem nicht toxisch. Im ersten Schritt erfolgt eine Separation der Leukozyten von den Erythrozyten, indem die Blutprobe auf 35 %iges Ficoll gelagert wird. Durch Zentrifugation werden die Erythrozyten von anderen Zellen klar getrennt. Dieser Versuch ist mit jeder Blutspezies durchführbar.

BÖYUM (1968) beschreibt eine Methode zur Trennung von Leukozyten, indem er Blut über eine Lösung von hoher Dichte lagert, in der eine Substanz zur Erythrozytenagglutination enthalten ist. Dabei wird ein Gemisch aus Methylzellulose oder Ficoll und Isopaque, einem Röntgenkontrastmittel, verwendet. Von einer 33,9 %igen Isopaquestämmung werden 10 Teile mit 16 Teilen einer Methylzelluloselösung vermischt. Nach Auflagern des Blutes findet an der Trennschicht eine Verklumpung der Erythrozyten durch Methylzellulose und ein Absinken auf den Boden statt. Wenn sich eine klare Zone zwischen Erythrozytenklumpen und Plasma ausgebildet hat, kann die Zeit, die für eine ausreichende Trennung benötigt wird, festgestellt werden. In der Plasmaschicht sind 30 - 50 % der weißen Zellen des Originalblutvolumens wiedergefunden worden. Die Trennungszeit liegt zwischen 15 - 65 Min. Bei dieser Trennungsmethode sind folgende Faktoren zu beachten:

1. Zusammensetzung der Mischung, die die Verklumpung der Erythrozyten bewirkt
2. ihre Dichte und Viskosität
3. die Osmolarität

4. Größe des Blutvolumens

5. Temperatur

Mit steigender Temperatur ist eine Verkürzung der Trennungszeit und ein Anwachsen des Prozentsatzes weißer Zellen zu beobachten. Das durchschnittliche Leukozytenergebnis liegt bei 66,4 % bei einer durchschnittlichen Trennungszeit von 40,3 Minuten. Beim Vergleich verschiedener Trennsysteme ist die Verwendung von Ficoll - Isopaque-verfahren auch bei Maus, Ratte, Kaninchen und Schafblut anwendbar (HULLIGER 1967). Isolierte Leukozyten zeigten bei in vitro Versuchen normale Reaktion auf PHA und eine Fähigkeit zur Antikörperbildung.

In Anlehnung an die Methoden von BÖYUM (1968) wurde von OTTO und SCHMID (1970) sowohl eine Lymphozyten- als auch eine Granulozytenisolierung aus Menschen- und Tierblut beschrieben. Als nicht hämolysierende und wasserunlösliche Substanz wurde eine dem Isopaque ähnliche Substanz, nämlich Jodamid (Uromiro) verwendet. Eine Jodamidlösung (spezifisches Gewicht 1,076) wird mit defibriniertem Blut überschichtet und zentrifugiert. Es erfolgt eine Sedimentierung der Erythrozyten und Granulozyten. Die Lymphozyten reichern sich als weißer Ring in der Trennschicht zwischen Serum und Jodamid an. Die Präparation von Lymphozyten ist frei von Granulozyten. Die Isolierung der Granulozyten erfolgt aus der Leukozytenpräparation und zwar durch Flotation auf der Grundlage von Jodamid, welches die einzelnen Blutkörperchen auf Grund ihrer unterschiedlichen spezifischen Gewichte trennt. Nach der Leukozytenisolierung durch Spontansedimentation nach Zusatz von Dextran und an-

schließender Hämolyse durch Ammoniumchlorid erfolgt die Isolierung der Granulozyten. Hierzu wird die Leukozytensuspension auf Jodamidlösung bzw. Uromiro überschichtet und zentrifugiert. Es erfolgt eine Sedimentation der Granulozyten. Die Lymphozyten reichern sich als weißer Ring in der Trennschicht zwischen Serum und Jodamid an. Lichtoptisch ist keine Zellschädigung feststellbar und im Trypanblautest sind weniger als 2 % gefärbte Zellen, d. h. eine gut erhaltene Lebensfähigkeit der Zellen nach der Isolierung ist vorhanden. Für die Granulozytenisolierung aus Rinderblut ist diese Methode wegen begrenzter Sedimentation der Zellen selbst unter Dextranzusatz als ungenügend befunden worden. Die Anreicherung der Granulozyten beträgt ca. 95 %.

3.3. Säulenverfahren

Säulen mit Glaswolle, Glasperlen, Baumwolle und Nylonfaser werden zur Trennung der zellulären Bestandteile aus dem Blut benutzt. Diese Säulenverfahren benutzen als Basis für ihre Trennung die unterschiedlichen Anhaftungseigenschaften der einzelnen Zellen.

CASSEN und HITT (1958) konnten auf Grund der Phagozytose von Gummi arabicum umhüllten Eisenpartikeln durch Granulozyten eine Trennung von Lymphozyten und Granulozyten erreichen.

HANKIN (1892) zeigte als erster, daß weiße Blutzellen und da besonders die Granulozyten an gewöhnlichem Glas haften. Für eine Anhaftung der Zellen sind verschiedene Faktoren wie Temperatur, Flussrate, Länge der Säule und das Vorhandensein von Ca^{++} und Mg^{++} Ionen wirksam. Anhaftung und Phagozytose sind von einem aktiven Prozeß in der Zellmembran abhängig, dessen Energie aus der Glykolyse stammt.

GARVIN (1959) erhielt bei Passage durch eine silikonisierte Glaswollsäule 30 - 89 % unbeschädigte Lymphozyten, wobei die Granulozyten zurückgehalten wurden.

RABINOWITZ (1964) modifizierte die Methode von GARVIN zur Isolierung von Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten, indem er mit Dextran sedimentierte Zellsuspensionen statt Vollblut verwendet und die Zellsuspensionen in der Säule bei 37° inkubiert, um eine bessere Anhaftung der Zellen zu fördern. Zur Erhaltung von weniger kontaminierten Lymphozytenfraktionen werden die Säulen mit einer abwechseln-

den Schicht von Glaswolle und Glasperlen beschickt. Sie halten Blutplättchen und nicht anhaftende Granulozyten länger zurück als Säulen ausschließlich mit Glasperlen. Für das Auswaschen der Lymphozyten ist die Zugabe von frischem Serum oder Plasma erforderlich, denn frisches Serum fördert die Adhäsion der Granulozyten. Mit Mg^{++} und Ca^{++} freier EDTA werden die polymorphkernigen Leukozyten aus der Säule gewaschen. Monozyten erscheinen im Ausfluß nach den Granulozyten, da sie eine stärkere Anhaftung besitzen. Eine Trennung der Erythrozyten von den Lymphozyten ist nicht möglich, während die Granulozytenfraktion frei von Erythrozyten war. Lebensfähigkeit, Motilität, Phagozytosefähigkeit und Entwicklung im Zellmedium waren bei den isolierten Zellen vorhanden.

LAMVIK (1966) stellte bei Isolierung von Lymphozyten mit einer Baumwollsäule eine Abhängigkeit der Zellausbeute von Art der Baumwolle und Dichte der Säule fest. Ebenso konnten Lymphozyten und Granulozyten aus Schweine- und Pferdeblut mittels Passage durch eine Glasperlensäule fraktioniert werden. Bei dieser Methode konnte eine Anreicherung der Lymphozyten von 70% und eine der Granulozyten von 30% erreicht werden. Eine bessere Reinheit der fraktionierten Zellen konnte beim Schweineblut erzielt werden (MICHALAK 1968). Die Zellen zeigen eine intakte Lebens- und Phagozytosefähigkeit.

PLOTZ und TALAL (1967) benützen Glasperlensäulen zur Fraktionierung von antikörperbildenden Zellen aus lymphoiden Organen. Bei dieser Fraktionierung ergaben sich zwei Zell-

fraktionen mit unterschiedlicher Anhaftung, wobei die anhaftenden Zellen reich an antikörperbildenden Zellen sind und schneller Antikörper bilden als die nicht anhaftenden Fraktionen (SALERNO und PONTIERI 1969).

Nylonfaser als Säulenmaterial erbringt Lymphozytensuspensionen mit weniger als 6% Granulozyten und Monozyten bei weitgehender Thrombozytenfreiheit. Die Erythrozyten stehen zu den Lymphozyten im Verhältnis 3:1 (HAVEMANN 1969). Im Gegensatz zu Nylonfaser erbringt die Trennung mit Glasperlen eine bessere Eliminierung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten (OPPENHEIM 1968).

3.4. Gradientenverfahren

Ein weiteres Verfahren zur Isolierung einzelner Zelltypen bietet die Zentrifugation auf einem Dichtegradienten. Als Medium wird dabei bevorzugt Ficoll, ein synthetisches Polysaccharid mit hohem Molekulargewicht, verwendet. Es lassen sich Ficollösungen mit hoher Dichte, niedriger Viskosität und osmotischen Druck herstellen, die keine toxische Wirkung auf die Zellen haben. Die Trennung von Zellen beruht auf deren unterschiedlicher Größe und Dichte. Mit Hilfe eines diskontinuierlichen Ficollgradienten konnten ZEMBALA und ASHERSON (1970) lebensfähige und biologisch intakte Mäusemakrophagen in 99 %iger Reinheit von Lymphozyten trennen.

NOBLE und CUTTS (1968) isolierten Leukozyten aus Hühner- und Menschenblut mit einem Leukozytengesamtergebnis von 85 % des Originalblutvolumens. Die Lebensfähigkeit, Motilität und Phagozytosefähigkeit der isolierten Zellen blieben erhalten. Nach Trennung der Erythrozyten von den Leukozyten mittels einer 35 %igen Ficollösung und anschließender Zentrifugation wird die erythrozytenfreie Leukozytensuspension auf einen kontinuierlichen Ficollgradienten gebracht und zentrifugiert. Im Gegensatz zu der Säulentrennung von RABINOWITZ (1964) konnten hierbei neben Granulozyten und Lymphozyten auch Monozyten isoliert werden. Bei Zentrifugation in einem Dichtegradienten wandern die verschiedenen Zelltypen im Gradienten und bilden getrennte Streifen, deren Lage abhängig vom Durchmesser und der Dichte der Zellen ist.

PERPER und ZEE (1968) beschreiben die Isolierung von Lymphozyten aus Menschen- und Tierblut auf einem diskontinuierlichen Saccharosegradienten. Nach Zentrifugation wurden alle mononukleären Zellen an der Zwischenschicht zwischen Plasma und Gradient auf Grund ihrer gleichen Zelldichte sedimentiert. Mit einer weiteren Differentialzentrifugation der Lymphozyten- Blutplättchensuspension auf einem Gradienten, wurde eine Trennung der zwei Zellpopulationen erreicht. Ebenso konnten mit dem Dichtegradienten-Zentrifugationsverfahren leukämische Zellen aus anderen Zellen isoliert werden unter Beibehaltung ihrer Lebensfähigkeit, Beweglichkeit und Morphologie (ABELOFF 1970). Bei der Differentialzentrifugation ist die Berechnung des Sedimentationsgrades der verschiedenen Zellen für eine möglichst gute Trennung wichtig, wobei Zelldurchmesser und Zelldichte eine Rolle spielen.

PRETLOW und BOONE (1969) beschreiben ein Computerprogramm, das eine schnelle Festlegung der besten Bedingungen für die bestmögliche Trennung von Zelltypen erlaubt, wie Ficollkonzentration, Gradientengefälle, Geschwindigkeit und Dauer der Zentrifugation. Wichtig bei dieser programmierten Zelltrennung ist, daß die Zellen während der Sedimentation ihren Durchmesser oder ihre Dichte nicht verändern. Mit dieser Methode gelang auch die Trennung von Lymphozyten und Makrophagen aus Meerschweinchen-Peritonealexsudat mit nahezu 100 %iger Reinheit. Eine Trennungsmethode, die die Unterschiede der Durchmesser zwischen einzelnen weißen Blutzellen zur Gewinnung von Lymphozyten

und Granulozyten zeigt, ist von PRETLOW und LUBEROFF (1973) beschrieben. Im Gegensatz zur isopyknischen Sedimentation wird mittels eines isokinetischen Dichtegradienten eine Zellisolierung erzielt, die eine vorherige Berechnung der Bedingungen mittels eines Computerprogrammes unnötig macht. Auf Grund enger Dichtebereiche von Zellen in einem Ficollgradienten, ist es möglich einen Gradienten herzustellen, in welchem die Sedimentation der meisten Säugerzellen nahezu isokinetisch ist.

C. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

1. Leukozytenisolierung aus Schweine- und Kälberblut nach dem Flotationsverfahren mit Jodamid (F. OTTO, 1970)

1.1. Materiel und Methode

Dextran T 250 (Mg 250.000) gelöst in physiologischer Kochsalzlösung (Pharmacia Fine Chemicals AB Uppsala, Schweden)

Uromiro 380 (80 % N-methylglukamin-Natriumsalzgemisch mit Jodgehalt von 380 mg/ml). Die Dichte von 1,082 wurde mit einem Aräometer eingestellt.

(Hersteller: Dr. Franz Köhler Chemie Alsbach an der Bergstraße)

Die Blutproben wurden ausschließlich Schlachttieren entnommen: 150 - 300 ml Heparinblut

(5 ml Heparin auf 100 ml Blut)

1 Liter defibriniertes Blut

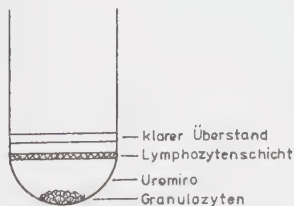
(Schüttelblut mit Glasperlen versetzt)

jeweils Proben von Schweine- und Kälberblut.

Das defibrinierte Blut wird mit NaCl ausgewaschen und 10 Minuten bei 1130 U/Min. zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wird die weiße Leukozytenschicht abpipettiert. Zur Sedimentation der roten Blutzellen werden 50 ml der 5 % Dextranlösung pro Tier zugegeben. Die Sedimentation erfolgt in Reagenz-

gläsern, die für 30 Minuten in einem Winkel von 45 Grad aufgestellt werden. Nach weiteren 5 Minuten in senkrechter Stellung ist die Sedimentation der Erythrozyten soweit abgeschlossen, daß der Leukozytenüberstand abgehoben werden kann. Nach Auswaschen mit NaCl werden die zellulären Elemente durch Zentrifugation 8 Minuten 2800 U/Min. angereichert. Eine Hämolyse der Erythrozyten wird durch Zugabe von 0,85% Ammoniumchlorid erreicht. Nach 15 minütigem Stehenlassen bei 4 Grad wird bei 1241 U/Min. zentrifugiert. Der Überstand wird abgesogen und das Sediment mit NaCl ausgewaschen. Durch Flotation mit Uromiro erfolgt eine Trennung der Granulozyten von den Lymphozyten aus dem Leukozytengemisch. 20 ml Uromiro 380 (spez. Gew. 1,082) werden in Zentrifugengläser (12,5 cm, 6 cm Ø) gegeben und mit der Leukozytensuspension vorsichtig überschichtet. Nach 25 minütiger Zentrifugation bei 1500 U/Min. reichern sich die Lymphozyten als weißer Ring in der Trennschicht zwischen klarem Überstand und Uromiro an, während sich die Granulozyten als Sediment absetzen.

Fig. 1



Nach Abpipettieren der Lymphozytenfraktion werden sowohl die Lymphozytenfraktion als auch die Granulozytenfraktion mit NaCl ausgewaschen.

Von den erhaltenen Suspensionen wurden folgende Tests gemacht:

1.2. Gesamtzellzahlbestimmung mit Kristallviolett

2,5 ml Kristallviolett (10,5 g Zitronensäure, 0,5 g Kristallviolett, Aqua dest. ad 500 ml) werden 0,05 ml der Zellsuspension zugegeben.

Die Gesamtzellzahl wird in einer Zählkammer nach Thoma ermittelt.

1.3. Differentialblutbild

Von den erhaltenen Zellsuspensionen wurden Ausstriche angefertigt und nach Pappenheim gefärbt. Das luftgetrocknete Präparat wird 3 Minuten mit May-Grünwaldlösung fixiert und nach Zusatz der gleichen Menge Aqua dest. noch 1 Minute gefärbt. Nach Abgießen der Farblösung wird eine frisch hergestellte Giemsalösung (1 Tropfen Giemsa auf 1 ml Aqua dest.) auf das nicht nachgespülte Präparat aufgegossen und 15 Minuten lang gefärbt. Danach wird gründlich mit Wasser gespült und das Präparat an der Luft getrocknet.

1.4. Vitalitätstest mit Trypanblau- oder Eosinfärbung

3 Tropfen Zellsuspension werden mit 3 Tropfen 1 % Trypanblaulösung vermischt.

Nach 30 minutiger Inkubation bei 37 Grad werden zur Verdünnung 4 ml PBS hinzugefügt. Die Zählung der an-gefärbten Zellen erfolgt in der Zählkammer nach Thoma. Die Zahl der gefärbten Zellen gibt an, wieviele Zellen nicht lebensfähig waren.

Anstelle von Trypanblaulösung kann auch 0,25 % Eosinlösung verwendet werden.

1.5. Phagozytostest mit Latexpartikeln

1 Tropfen der Latexsuspension

(c, 1 ml Latex + 4,9 ml TC-Medium 5 % foetales Kälberserum oder autologes Serum) wird mit einem Tropfen der Phagozytensuspension auf einem Objektträger vorsichtig vermischt und in einer feuchten Kammer 10 Minuten bei 37 Grad inkubiert. Anschließend wird mit warmer NaCl (37 Grad) der Objektträger abgespült, um die nicht phagozytierten Latexpartikel abzuspielen. Nach dem Trocknen wird nach PAPPENHEIM gefärbt und der Prozentsatz der Zellen ermittelt, welche die Latexpartikel phagozytiert haben.

1.6. ^{14}C Glukosetest zur Phagozytoseaktivitätsbestimmung

(nach BUSCHMANN und ALTSTAEDTEN 1973)

Die Messung der Oxidation von Glukose - ^{14}C stellt ein geeignetes Verfahren dar, um die Phagozytoseaktivität von Blutleukozyten beim Haustier zu messen. In 25 ml Erlenmeyerkolben, in deren Boden ein Ring zur Aufnahme eines kleinen Glasbechers eingeschmol-

zen ist, werden 0,1 ml Difco-Latex Partikel (Durchmesser 0,81 μ m, Konzentration: 2×10^9 Partikel/ml physiol. Kochsalzlösung), 1 ml Hanks-Lösung enthaltend 0,0625 nCi Glukose- 14 C und 0,2 ml Vollblut bzw. 2×10^6 isolierte Granulozyten zusammengebracht. Die Kolben werden mit Gummikappen verschlossen und 30 Minuten bei 37 Grad geschüttelt. Anschließend werden durch die Gummikappe 1 ml 2 N Salzsäure in den Erlenmeyerkolben und 0,4 ml Hyamin-10 X-Hydroxid in den Glasbecher am Boden des Erlenmeyerkolbens injiziert. Nach erneutem 30 minütigem Bebrüten bei 37 Grad unter ständigem Schütteln, währenddessen das entstandene 14 CO₂ vom Hyaminhydroxid aufgefangen wird, werden die Glasbecher mit der Hyaminhydroxidlösung in Meßfläschchen mit 10 ml Szintillatorlösung (Fluor alloy-TLA in TOLUOL, BECKMAN) verbracht und die Radioaktivität in einem Flüssigkeitsscintillationszähler (PACKARD) gemessen. Von jeder Probe werden 2 Ansätze mit Latex-Partikeln (Versuch 1 und 2) und 2 Ansätze ohne Zusatz von Latex-Partikeln (Kontrolle 1 und 2) durchgeführt. Anschließend wird das Verhältnis der Impulse pro Minute Meßdauer von phagozytierenden zu ruhenden Zellen, d. h. des Mittelwertes von Versuch 1 und 2 zu Mittelwert von Kontrolle 1 und 2 bestimmt (P/R).

ERGEBNISSE

Die Ergebnisse der Untersuchungen an Schweine- und Kälberblut sind in den Tabellen 2 - 5 zusammengefaßt.

1.2. Gesamtzellzahlbestimmung

Tabelle 2: Gesamtzellzahl von isolierten Lymphozyten- und Granulozytenfraktionen aus Schweine- und Kälberblut mittels des Flotationsverfahrens mit Jodamid nach F. OTTO (1970).

	Lymphozyten- fraktion	Granulozyten- fraktion
Schweineblut (Schüttelblut)	$0,55 \times 10^7/\text{ml}$	$23,2 \times 10^7/\text{ml}$
Schweineblut (Heparin)	$3,3 \times 10^7/\text{ml}$	$16 \times 10^7/\text{ml}$
	$0,1 \times 10^7/\text{ml}$	$3,9 \times 10^7/\text{ml}$
	$2,2 \times 10^7/\text{ml}$	$2,8 \times 10^7/\text{ml}$
Kälberblut (Schüttelblut)	$1,5 \times 10^6/\text{ml}$	$55,5 \times 10^6/\text{ml}$
Kälberblut (+ Heparin)	$2 \times 10^6/\text{ml}$	$15,5 \times 10^6/\text{ml}$
	$1,5 \times 10^6/\text{ml}$	$4 \times 10^6/\text{ml}$
	$0,5 \times 10^6/\text{ml}$	$0,5 \times 10^6/\text{ml}$

Aus Tabelle 2 geht hervor, daß in den Granulozytenfraktionen höhere Zellkonzentrationen zu finden sind als in den Lymphozytenfraktionen, wobei die Zellausbeute aus Schweineblut größer ist als aus Kälberblut.

Tabelle 3: Prozentualer Anteil der Lymphozyten und Granulozyten in den Lymphozyten- und Granulozytenfraktionen aus Schweine- und Kälberblut nach Auftrennung mittels des Flotationsverfahrens mit Jodamid nach F. OTTO (1970)

Schwein			Kalb	
	Lympho- zyten- fraktion	Granulo- zyten- fraktion	Lympho- zyten- fraktion	Granulo- zyten- fraktion
	Lym- Gra- pho nulo	Lym- Gra- pho nulo	Lym- Gra- pho nulo	Lym- Gra- pho nulo
Schüttel- blut	100% -	6,3% 93 %	100% -	10,7% 43,0%
Blut mit Heparin	100% -	5,4% 94 %	100% -	10,3% 90,6%
Blut mit Heparin	97,3% 2,9%	9,4% 94 %	96,3% 3,1%	10,5% 78,6%
Blut mit Heparin	95,2% 4,7%	1,9% 98,%	96,8% -	15 % 48,0%

Die in Tabelle 3 aufgeführten Werte zeigen, daß die Lymphozyten bei Schwein und Kalb gleich gut isoliert werden können, bei der Granulozytenisolierung aber unterschiedliche Werte zu finden sind.

1.3. Differentialblutbild

Die Ergebnisse sind in obenstehender Tabelle Nr. 3 zusammengefaßt.

1.4. Vitalitätstest

Tabelle 4: Prozentsatz der angefärbten Zellen im Vitalitätstest nach Auftrennung der Lymphozyten und Granulozyten mittels des Flotationsverfahrens mit Jodamid nach F. OTTO (1970)

	Lymphozyten- fraktion	Granulozyten- fraktion
Schwein Schüttelblut	0	9,2 %
Schwein Heparinblut	0	14,6 %
Kalb Heparinblut	0	41,8 %

Mit Schüttelblut vom Kalb war wegen starker Erythrozytenkontamination keine Zellzählung möglich.

Aus Tabelle 4 geht hervor, daß nach der Isolierung bei den Lymphozyten keine Anfärbung festgestellt werden konnte, so daß auf eine 100 %ige Lebensfähigkeit der isolierten Lymphozyten geschlossen werden kann.

1.5. Phagozytostest

Anhand des Phagozytostestes mit Latexpartikeln konnte keine eindeutige Phagozytose festgestellt werden.

1.6. ^{14}C - Glukosetest zur Phagozytoseaktivitätsbestimmung

Anhand von Granulozytenfraktionen, die durch Flotation mit Uromiro gewonnen wurden, wurde aus dem Verhältnis der $^{14}\text{CO}_2$ - Bildung aus Glukose 1 - ^{14}C in phagozytierenden und ruhenden Granulozyten (P/R) auf die Phagozytoseaktivität der isolierten Zellen geschlossen.

In Tabelle 5 sind die P/R - Werte der aus Schweine- und Kälberblut isolierten Granulozyten zusammengefaßt.

Tabelle 5: P/R - Werte bei Granulozyten aus Schweine- und Kälberblut nach Isolierung mittels des Flotationsverfahrens mit Jodamid nach F. OTTO (1970)

Probe Nr.	Granulozyten- fraktion (2×10^6 Zellen/ml)	Schweineblut	Kälberblut
		P/R	P/R
I	ohne Serum	1,43	0,69
	mit autologem Serum, aktiv	2,37	1,46
	mit autologem Serum, inaktiviert	2,01	1,13
II	ohne Serum	1,18	-
	mit autologem Serum, aktiv	1,06	-
	mit autologem Serum, inaktiviert	1,52	-

Aus der Tabelle 5 geht hervor, daß bei aus Schweineblut isolierten Granulozyten der höchste P/R - Wert bei Zugabe von autologem inaktiviertem Serum zu sehen war.

Die Werte beim Kälberblut lagen niedriger. Der höchste P/R - Wert war bei Zugabe von autologem aktivem Serum. Dies deutet darauf hin, daß die Zellfraktionen des Schweineblutes eine bessere Stoffwechselaktivität beibehalten hatten als die Zellfraktionen aus Kälberblut.

2. Leukozytenisolierung aus Schweine- und Kälberblut mittels einer Nylonfasersäule

2.1. Material und Methode

Leukopak Leucocyt Filter (Penwal Laboratories, Div.
of Travenol Lab., Illinois, USA)

Hankslösung (HANKS Stock solution, Oxoid Limited,
London)

Pufferlösung:	Na_2EDTA	0,2 g
	NaCl	8,0 g
	KCL	0,2 g
	Na_2HPO_4	1,15g
	KF_2PO_4	0,2 g
	Glukose	0,2 g

ed 1.000 ml Aqua dest. pH 7,4

Die folgenden Blutproben wurden wieder von Schlacht-
tieren genommen: 100 - 150 ml venöses Blut mit
Heparinzusatz von Schwein und
Kalb und jeweils

80 - 100 ml Blut zur Serumgewinnung vom Schwein

120 ml Blut zur Serumgewinnung vom Kalb

Der Leucopakfilter wird geöffnet und eine entspre-
chende Menge der Nylonwatte entnommen. Eine Glas-
säule, siehe Fig. 2, wird locker mit Nylonwatte ge-
packt und an einem Stativ senkrecht befestigt. Auf
37 Grad angewärmte Hankslösung wird mit 10 % autolo-
gem Serum versetzt und langsam durch die Nylonfaser-
säule geschickt bis die Nylonwatte in der Säule ganz

durchtränkt ist. Dann wird das im Wasserbad auf 37° erwärmte Blut langsam von oben auf die Säule pipetiert. Der Auslauf wird in silikonisierten Zentrifugengläsern aufgefangen (12 cm lang 3 cm $\varnothing$).

Dieser Auslauf wird als Fraktion I gekennzeichnet.

Die Säule wird dann mit 37° warmer Hankslösung unter Zusatz von 15 %igem autologem Serum nachgespült, bei einer Durchflußrate von 10 - 20 ml/Minute. Danach wird die Säule mit 37° warmer Pufferlösung eluiert. Dieses Eluat wird ebenfalls in silikonisierten Zentrifugengläsern aufgefangen und als Fraktion II bezeichnet. Diese Fraktion wird 8 Minuten bei 2800 U/Min. zentrifugiert und der Überstand abgehoben.

Folgende Tests werden mit Fraktion I und II durchgeführt:

Fraktion I:

2.2. Gesamtzellzahlbestimmung

2.3. Differentialblutbild

Fraktion II:

2.2. Gesamtzellzahlbestimmung

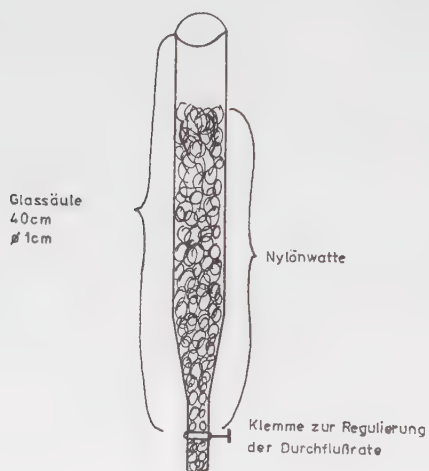
2.3. Differentialblutbild

2.4. Vitalitätstest

2.5. Phagozytostest

2.6. ^{14}C - Glukosetest zur Phagozytoseaktivitätsbestimmung

Fig. 2 Säule mit Nylonwatte



Ergebnisse: Untersuchungen von Fraktion I
und Fraktion II
isoliert aus Schweine- und Kälberblut.

2.2. Gesamtzellzahl mit Kristallviolett bei Fraktion I

Die Zellsuspensionen aus Schweineblut enthalten Konzentrationen von

$7,25 \times 10^6$ Zellen/ml bis $26,7 \times 10^6$ Zellen/ml.

Beim Kälberblut ergeben sich bei Feststellung der Gesamtzellzahl Werte von

$2,25 \times 10^6$ Zellen/ml bis $18,7 \times 10^6$ Zellen/ml. Somit zeigen sich beim Kälberblut im Vergleich mit Schweineblut geringere Zellausbeuten.

Ebenfalls wurden die Gesamtzellzahlen mittels Kristallviolett für die Fraktion II aus Schweine- und Kälberblut ermittelt. Die Konzentrationen liegen auch hier mit

2×10^6 Zellen/ml bis $5,6 \times 10^7$ Zellen/ml für die Zellsuspensionen aus Schweineblut höher als aus Kälberblut, die von

$3,2 \times 10^6$ Zellen/ml bis $1,45 \times 10^7$ Zellen/ml reichen.

In Tabelle 6 sind die Gesamtzellzahlen der Fraktionen I und II im Vergleich mit Schweine- und Kälberblut aufgezeigt.

Tabelle 6: Gesamtzellzahlen der Fraktionen I (Lymphozytenfraktion) und II (Granulozytenfraktion), aufgetrennt mittels einer Nylonfasersäule.

	Schweineblut	Kälberblut
Fraktion I	$7,5 \times 10^6/\text{ml}$	$2,25 \times 10^6/\text{ml}$
(Lymphozyten- fraktion)	$7,25 \times 10^6/\text{ml}$	$4,0 \times 10^6/\text{ml}$
	$26,7 \times 10^6/\text{ml}$	$18,7 \times 10^6/\text{ml}$
	$0,2 \times 10^7/\text{ml}$	$0,15 \times 10^7/\text{ml}$
	$0,05 \times 10^7/\text{ml}$	$0,1 \times 10^7/\text{ml}$
Fraktion II	$2 \times 10^6/\text{ml}$	$3,25 \times 10^6/\text{ml}$
(Granulozyten- fraktion)	$40 \times 10^6/\text{ml}$	$4 \times 10^6/\text{ml}$
	$36,5 \times 10^6/\text{ml}$	$23 \times 10^6/\text{ml}$
	$5,6 \times 10^7/\text{ml}$	$1,45 \times 10^7/\text{ml}$
	$1,4 \times 10^7/\text{ml}$	$1,35 \times 10^7/\text{ml}$

2.3. Differentialblutbild

Nach Anfertigung von Ausstrichen und entsprechender Färbung wurde lichtmikroskopisch auf Grund der Morphologie der Prozentsatz von Granulozyten und Lymphozyten in Fraktion I und II aus Schweine- und Kälberblut festgestellt.

In Tabelle 7 ist der durchschnittliche Prozentsatz der Lymphozyten in der Fraktion I und der Granulozyten in der Fraktion II bei Schweine- und Kälberblut aufgezeigt.

Tabelle 7: Durchschnittlicher Prozentsatz der Lymphozyten in Fraktion I und der Granulozyten in Fraktion II bei Schweine- und Kälberblut nach Auftrennung in einer Nylonfasersäule.

	Fraktion I	Fraktion II
Schwein	78 % Lymphozyten	96 % Granulozyten
Kalb	92 % Lymphozyten	99 % Granulozyten

Die in Tabelle 7 angegebenen Werte weisen darauf hin, daß aus Kälberblut eine größere Anreicherung von Lymphozyten und Granulozyten erreicht werden konnte.

Tabelle 8: Prozentsatz der Zellbestandteile in Fraktion I und II bei Schweine- und Kälberblut nach Trennung in einer Nylon-fasersäule.

	Fraktion I				Fraktion II			
	Lym- pho- zyten	Mono- zyten	Gra- nulo- zyten	Ery- thro- zyten	Lym- pho- zyten	Mono- zyten	Gra- nulo- zyten	Ery- thro- zyten
Schwei- neblut	77 %	-	-	+	2 %	-	98,6%	-
	82 %	4 %	-	mes- senh.	1,2 %	0,6 %	98,2%	-
	78 %	-	-	viele	-	-	93%	-
	78 %	-	-	viele	4 %	1 %	95%	-
Kälber- blut	96 %	3 %	-	+	-	-	100 %	-
	97 %	2 %	-	+	-	-	100 %	-
	92 %	-	8,7%	+	-	-	100 %	-
	85 %	1,4%	-	+	2 %	1 %	97 %	-

Fraktion I zeigt beim Schweineblut einen größeren Reinheitsgrad des Lymphozytenanteils als beim Kälberblut. Im Schweineblut läßt sich eine erhebliche Kontamination mit Erythrozyten feststellen.

Fraktion II ergibt einen gleich hohen Prozentsatz von Granulozyten bei Schweine- und Kälberblut ohne Verunreinigung durch Erythrozyten.

Diese Versuchsanordnung eignet sich zur Trennung von Lymphozyten- und Granulozyten aus Schweine- und Kälberblut. Mit verhältnismäßig kurzem Zeitaufwand und einfachen technischen Mitteln sind gute Ergebnisse zu erzielen.

2.4. Vitalitätstest mit Eosin

Die Untersuchungen ergaben sowohl mit Schweine- als auch mit Kälberblut einen durchschnittlichen Prozentsatz von 7 % gefärbten Zellen. Dies deutet auf eine gut erhaltene Lebensfähigkeit nach Trennung der Zellen hin.

2.5. Phagozytostest mit Latexpartikeln

Bei diesem Test konnte keine eindeutige Phagozytose der isolierten Granulozyten nachgewiesen werden.

2.6. ^{14}C - Glukosetest zur Phagozytoseaktivitätsbestimmung

Die Phagozytoseaktivitätsmessung mit isolierten Granulozyten aus Schweineblut zeigte einen P/R - Wert von 1,07-4,53. Die Höchstwerte ergaben sich bei Zugabe von autologem, aktivem Serum. Mit isolierten Granulozyten aus Kälberblut konnte kein P/R - Wert gemessen werden.

Aus der Tabelle 11 sind die P/R - Werte der Schweineblutzellfraktionen und Kälberblutzellfraktionen bei Zugabe verschiedener Seren ersichtlich.

Tabelle 9: P/R - Werte bei Granulozytenfraktionen aus Schweine- und Kälberblut isoliert mittels einer Nylonfasersäule unter Zugabe verschiedener Seren.

Tierart	Probe - Nr.	Serumzusatz	P/R
Schwein	1	ohne Serum	1,55
	2	ohne Serum	2,16
	3	autologes Serum aktiv	4,83
	4	autologes Serum aktiv	3,90
	5	autologes Serum inaktiviert	4,53
	6	autologes Serum inaktiviert	2,29
	7	Pferde-Serum aktiv	1,99
	8	Pferde-Serum inaktiviert	2,13
	9	Schaf-Serum aktiv	1,44
	10	Schaf-Serum inaktiviert	1,07
Kälber	1	autologes Serum aktiv	0,69
	2	autologes Serum aktiv	1,62
	3	ohne Serum	0,84
	4	ohne Serum	0,80
	5	autologes Serum inaktiviert	0,72
	6	autologes Serum inaktiviert	0,72

3. Leukozytenisolierung mittels Methocel-Isopaque nach der Methode von A. BÖYUM (1968)

3.1. Material und Methode

Isopaque = Ronpacon der Fa. Cilag Chemie, Alsbach.

(75 %), trijodiertes Röntgenkontrastmittel

Methylzellulose = Methocel, wasserlöslicher Gummi

(Dow Chemical Company Midland, Michigan) Viskosität 25

80 ml Isopaque + 100 ml Aqua dest. ergibt eine 33,9 %ige Stammlösung mit einem ph-Wert von 6,8 und einer Dichte von 1,2 g/ml.

Von Methylzellulose wird eine 2 %ige Stammlösung mit Aqua dest. hergestellt.

10 - 20 ml venöses, heparinisiertes Schweine- und Kälberblut.

10 Teile der Isopaquestammlösung (33,9 %) und 16 Teile der Methocelstammlösung (2 %ig) werden gemischt. Die Mischlösung ist klar und ist immer frisch vor jedem Versuch anzusetzen, da sonst keine Überschichtung mit Blut möglich ist. Nun werden jeweils 3 ml der Isopaque-Methocellösung in Reagenzgläser pipettiert und vorsichtig mit je 2 ml der Blutproben von Schwein und Kalb überlagert. Um den Einfluß der Temperatur auf die Trennungszeit festzustellen, wurden mehrere Röhrchen angesetzt (10 cm lang, 3 cm Ø). Dazu wurden jeweils 10 ml der Isopaque-Methocellösung mit 6,66 ml Blut überlagert.

Die Trennungszeit in den Röhrchen wurde bei folgenden Temperaturen beobachtet: 4°, 20° und 37° C.

Ebenso wurde eine Versuchsreihe mit verschiedenen Dichten angelegt, ausgehend von einer 2 % Methocelstammlösung.

Ansatz für Lösungen verschiedener Dichten mit Methocel-lösung (2 %) und Isopaque-Stammlösung (33,9 %).

Dichte	Methocel (2 %)	Isopaque (33,9 %)
1,06	24,14 ml	10 ml
1,07	19,12 ml	10 ml
1,09	12, 5 ml	10 ml
1, 1	10, 2 ml	10 ml
1,11	8,33 ml	10 ml
1,12	6,78 ml	10 ml

Die Trennungszeit wird dann abgelesen, wenn eine klare Zone von ca. 0,5 - 1 cm zwischen dem Plasma und dem grossen Erythrozytenklumpen sichtbar ist. Die Isopaque-Methocellösung bewirkt eine Verklumpung der Erythrozyten und ein Absinken auf den Boden.

Dieser klare Überstand, der die Leukozyten und auch einige wenige Erythrozyten enthalten kann, wird vorsichtig abpipettiert ohne die Erythrozyten aufzuwirbeln und anschließend 8 Minuten bei 2800 U/Min. zentrifugiert. Von der erhaltenen Zellsuspension wird dann die Gesamtzellzahl mit Kristallviolett bestimmt und eine Färbung nach PAPPENHEIM für ein Differentialblutbild angefertigt.

Ergebnisse

Die Isopaque-Methocellösung bewirkt eine Verklumpung der Erythrozyten und ihr Absinken auf den Boden. Bei den Proben mit Schweineblut geschah das Absinken erst in kleineren Klumpen und nachfolgend in größeren Klumpen, wohingegen beim Kälberblut ein einheitliches Absinken der Erythrozyten zu beobachten war. Die verschiedenen Temperaturen von 37°C , 20°C und 4°C sollen den Einfluß auf die Trennungszeit und auch auf das Leukozytenergebnis aufzeigen. Je höher die Temperatur ist, desto kürzer war die Trennungszeit sowohl bei Schweine- als auch bei Kälberblut.

Tabelle 10 zeigt die verschiedenen Temperaturen in Bezug auf die Trennungszeit und Leukozytensausbeute.

3.2. Gesamtzellzahlbestimmung

Die Ergebnisse der Gesamtzellzahlbestimmung sind in Tabelle 10 zusammengefaßt.

3.3. Differentialblutbild

Die Ergebnisse des Differentialblutbildes sind in Tabelle 10 zusammengefaßt.

Tabelle 10: Trennungszeit, Gesamtzellzahl und Differentialblutbild bei verschiedenen Temperaturen nach Leukozytenisolierung mit Methocel-Isopaque nach A. BÖYUM (1968)

a) Schweineblut Temperatur	37°C		20°C		4°C	
Trennungszeit	15 Min.		50 Min.		60 Min.	
Gesamtzellzahl	0,05 x 10 ⁷ /ml		0,4 x 10 ⁷ /ml		1,2 x 10 ⁷ /ml	
	0,05 x 10 ⁷ /ml		0,5 x 10 ⁷ /ml		0,6 x 10 ⁷ /ml	
Differentialblutbild	Gra-nulo	Lym-pho	Gra-nulo	Lym-pho	Gra-nulo	Lym-pho
	45 %	55 %	40 %	59 %	42 %	57 %
	fast keine Erythrozyten					
b) Kälberblut Temperatur	37°C		20°C		4°C	
Trennungszeit	60 Min.		90 Min.		120 Min.	
Gesamtzellzahl	0,1 x 10 ⁷ /ml		0,3 x 10 ⁷ /ml		0,3 x 10 ⁷ /ml	
	0,05 x 10 ⁷ /ml		0,05 x 10 ⁷ /ml		0,05 x 10 ⁷ /ml	
Differentialblutbild	Gra-nulo	Lym-pho	Gra-nulo	Lym-pho	Gra-nulo	Lym-pho
	55,7%	44,2%	41 %	59 %	48,5%	50 %

Diese Methode ist gut anwendbar zur Leukozytenisolierung bei kleineren Blutvolumina. Sie erfordert eine geringe technische Ausstattung und wenig Zeitaufwand. Beim Schweineblut ist eine klare scharfe Zone als Leukozytenüberstand

ausgeprägt, die ein genaues Abpipettieren ermöglicht, wohingegen bei den Proben mit Kälberblut eine exakte Abnahme der leukozytenreichen Trennschicht durch undeutliche und schmale Ausprägung der Trennzone erschwert wurde.

Die verschiedenen Dichten der 2 %igen Methocelstammlösung ergaben in Bezug auf die Trennungszeit keine wesentlichen Abweichungen der obengenannten. Die Gesamtzellzahl erreichte umso weniger Zellkonzentration/ml je höher die Dichte der Isopaque-Methylzellulose-Mischung war.

3.4. ^{14}C - Glukosetest zur Phagozytoseaktivitätsbestimmung

Bei diesem Versuch wurden nur Schweineleukozyten auf ihre Phagozytoseaktivität getestet, da Kälberleukozyten mit dieser Trennungsmethode nur ungenügend gewonnen werden konnten. Beim Schweineblut lagen die P/R - Werte bei 1,10 - 2,21.

Tabelle 11: F/R - Werte bei Leukozytenisolierung aus
Schweineblut mit Methylzellulose-Isopaque.

Probe Nr.	Serumzusatz (autolog)	P/R
I	ohne Serum	1,10
II	mit aktivem Serum	2,21
III	ohne Serum	1,95
IV	mit aktivem Serum	2,04
V	mit inaktiviertem Serum	1,45

4. Lymphozytenisolierung durch Zentrifugation in einem Ficoll-Isopaque-Medium (HARRIS und UKAEJIOFO 1970)

4.1. Material und Methode

Ficoll 100 g MG etwa 400.000 (Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Schweden),

Isopaque = Ronpacon (75 %) Cilag Chemie, Alsbach an der Bergstraße.

5 - 10 ml venöses Blut von Schwein und Kalb defibriniert mit Glasperlen (Schüttelblut)

24 Teile des 9%igen Ficoll und 10 Teile der 34 %igen Stammlösung von Isopaque werden gemischt. 0,75 ml des Schüttelblutes werden jeweils mit 0,75 ml PBS verdünnt. 2 ml des Ficoll-Isopaquagemisches werden in einem 10 cm hohen Zentrifugenglas vorsichtig mit dem verdünnten Blut überschichtet. Nach 20 minütiger Zentrifugation bei 400 g bei Zimmertemperatur liegen die Lymphozyten als schmale weiße Schicht zwischen der Ficoll-Isopaque-berührungsfläche. Die Lymphozyten werden vorsichtig abpipettiert, um eine Verunreinigung mit Erythrozyten zu vermeiden. Zu den Lymphozyten wird ein gleiches Volumen Hankslösung zugegeben und nochmals 5 Sekunden bei 6600 U/Minute = 4500 g zentrifugiert. Der Überstand wird abgehoben und die Lymphozyten im Sediment werden in Eigenserum aufgenommen.

Ergebnisse

4.2. Die Gesamtzellzahlbestimmung mit Kristallviolett

ergeb beim Schwein eine Konzentration von $12,6 \times 10^6$ Zellen/ml und beim Kalb $4,2 \times 10^6$ Zellen/ml. Die durchschnittliche Zellausbeute an Lymphozyten lag beim Schweine- und Kälberblut bei 85 - 90 %.

4.4. Vitalitätstest

Der Eosintest brachte keine Färbung der Zellen, d. h., daß die Lebensfähigkeit der Zellen durch die Trennung voll erhalten geblieben ist. Bei lichtmikroskopischer Betrachtung sehen die Zellen frisch aus, d. h. sie scheinen morphologisch intakt.

In Tabelle 12 sind die Ergebnisse der Gesamtzellzahlbestimmung mit Kristallviolett, des Vitalitätstestes mit Eosin und des Differentialblutbildes aus Schweine- und Kälberblut^{die} durch Zentrifugation in Ficoll-Isopaque isoliert wurden, zusammengefaßt.

4.3. Differentialblutbild

Die Ergebnisse des Differentialblutbildes sind in Tabelle 12 zusammengefaßt.

Tabelle 12: Zusammenfassung der Ergebnisse der Gesamtzellzahlbestimmung, des Vitalitätstestes und Differentialblutbild nach Isolierung aus Schweine- und Kälberblut durch Zentrifugation in Ficoll-Isopaque nach HARRIS und UKAEJIOFO (1970).

	Schwein		Kalb		
Gesamtzellzahl	12,6 x 10 ⁶ /ml		4,2 x 10 ⁶ /ml		
Vitalitätstest	0 gefärbt		0 gefärbt		
Pappenheim-färbung	Lym-pho 90 %	Granulo 2 %	Lym-pho 92 %	Granulo 0	Mono 2

Diese Trennungsmethode ist sowohl mit Schweine- als auch Kälberblut gut durchführbar zur Gewinnung von reinen Lymphozytensuspensionen. Der technische und zeitliche Aufwand sind gering.

5. Leukozytenisclierung aus Schweine- und Kälberblut
mittels eines Ficolllichtegradienten modifiziert
nach T. G. PRETLOW und D. E. LUBEROFF (1973)
-

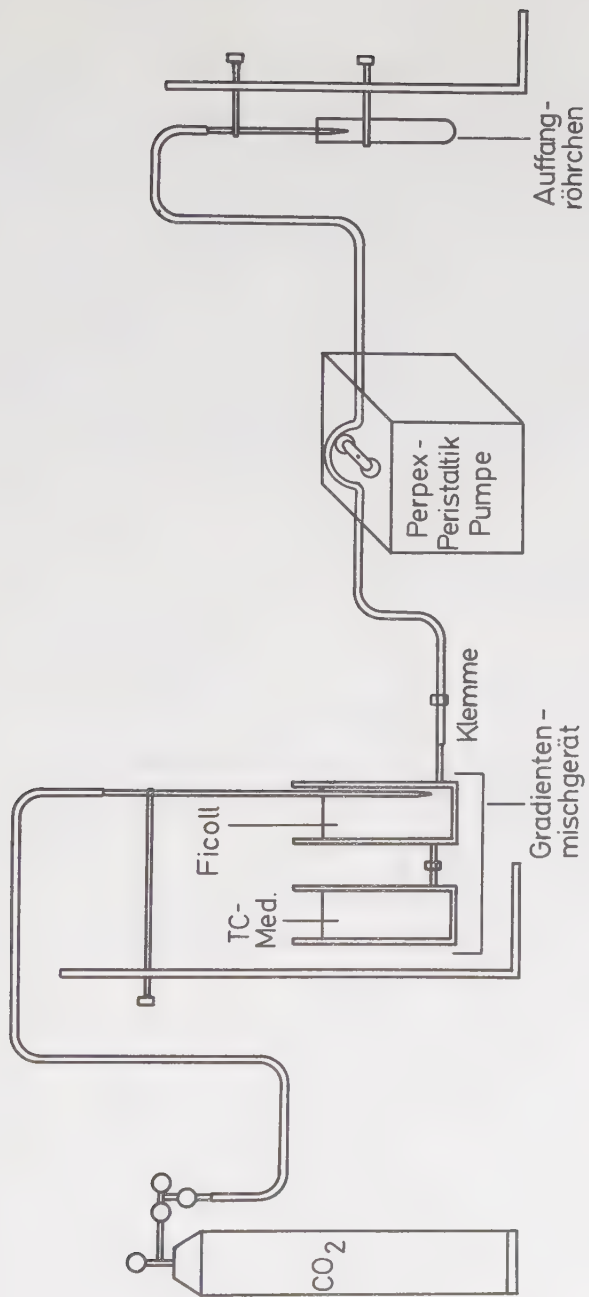
5.1. Material und Methode

Ficoll = ein synthetisches Polymerisat aus Saccharose
mit hohem Molekulargewicht (MG = 400.000)

Mit Hilfe von Ficoll erhält man Lösungen mit hoher
Dichte, niedriger Viskosität und niedrigerem osmo-
tischen Druck.

Herstellung des Ficollgradienten in TC-Medium.

In ein 100 ml Polykarbonat-Zentrifugenröhrchen
(Höhe 16 cm, Durchmesser 3 cm) werden 5,5 ml einer
45 %igen Ficollösung vorgelegt. Der Gradientenmischer
(siehe Abbildung) besteht aus 2 Kammern, von denen
die eine mit 5,5 %igem Ficoll und die andere mit
TC-Medium gefüllt wird. Für eine gute Durchmischung
der Ficollösung sorgt durchperlendes CO₂. Der fertig-
gestellte lineare Gradient von 70 ml mit einer Höhe
von 11 cm wird über Nacht bei 4 Grad C im Kühlschrank
gelagert. Ebenso wurde ein 9 cm langer Gradient herge-
stellt. Nachdem die Blutproben 5 Minuten bei 1.000 U/Min.
zentrifugiert wurden, werden 7 ml des leukozytenreichen
Überstandes vorsichtig mit der Pipette auf den Gradienten
aufgelagert. Bei 97 g und 4 Grad C wird 14 Minuten lang
zentrifugiert.



Sammeln der einzelnen Fraktionen

Das Gradientenröhrchen wird mit einer Gummikappe fest verschlossen. Mit Hilfe einer langen Kanüle wird eine 25 %ige Saccharoselösung unterschichtet. Dadurch wird der Gradient durch ein feines Glasröhrchen mit Schlauch nach oben gedrückt und in 4 ml Fraktionen in Reagenzröhrchen aufgefangen. Es werden bis zu 20 Fraktionen in Reagenzröhrchen aufgefangen. Anschließend werden von jeder Fraktion Ausstriche angefertigt und nach PAPPENHEIM gefärbt.

Ergebnisse

5.2. Differentialblutbild

Die Ausstriche konnten keine eindeutige saubere Trennung der Lymphozyten und Granulozyten erkennen lassen, obwohl im Schweineblut ein Hauptanteil der Lymphozyten in den Fraktionen 9 - 11 vorhanden war, mit etwa 90 % der gezählten Zellen. Eine saubere Trennung der Zellen von Erythrozyten war nicht ersichtlich. In der Fraktion 18 betrug der Granulozytenanteil 87 %.

Beim Kälberblut lag der Lymphozytenhauptanteil mit nahezu 100 % in der Fraktion 8.

Fraktion 17 und 18 erbrachten einen Granulozytenprozentsatz von 71 %. Auch hierbei war keine saubere Trennung von Erythrozyten und den übrigen Zellen möglich. Bei dem Gradienten von 9 cm konnte sowohl mit Schweine- als auch mit Kälberblut keine eindeutige Trennung von Lymphozyten und Granulozyten in einzelnen Fraktionen erzielt werden. Die Zellen sehen lichtoptisch morphologisch unverändert aus. Die Ergebnisse mit dieser Methode erbrachten keine zufriedenstellende Trennung der Zellen.

D. DISKUSSION

Für Studien von biologischen Funktionen der Zellen, wie z. B. Phagozytose, biochemische Untersuchungen, Chromosomenanalysen, Bearbeitung immunologischer Probleme, wie Organtransplantationen oder Gewinnung von Antilymphozytenseren, ist eine möglichst schnelle und reine Präparation von Lymphozyten- und Granulozytensuspensionen erforderlich. Zahlreiche Methoden für eine Zelltrennung sind hauptsächlich mit Menschenblut durchgeführt worden. Die hier beschriebenen Trennungsvorgänge mit Schweine- und Kälberblut haben zu unterschiedlichen Ergebnissen geführt, wobei sich Kälberblut für eine Trennung schlechter eignete als Schweineblut.

Bei Verwendung von Schüttelblut im Gegensatz zu Heparinblut waren bei der Trennungsmethode mit Jodamid bessere Ergebnisse zu erzielen. Die Ausbeute lag höher, ebenso ergab der Vitalitätstest mit Trypanblau bei Schüttelblut weniger gefärbte Zellen. Dies deutet auf eine besser erhaltene Lebensfähigkeit der Zellen hin. Anhand des ^{14}C Glukosetests konnte auf eine vorhandene Stoffwechselaktivierung im Verlauf der Phagozytose bei den isolierten Zellen geschlossen werden, die sich am besten durch Suspension in autologem Serum feststellen ließ, während eine Phagozytose nach Inkubation mit Latexpartikeln nicht beobachtet werden konnte. Die Reinheit der Lymphozyten und Granulozyten lag bei 93 - 100 %, wobei eine Erythrozytenkontamination trotz mehrfacher Hämolyse mit Ammoniumchlorid nicht auszuschließen war.

F. OTTO (1970) beschreibt, daß sich diese Methode für Granulozytenisolierung aus Rinderblut als ungeeignet erweist, da es trotz Dextranzusatz nur zu einer begrenzten Sedimentation der Zellen kommt. Dementsprechend konnte bei den hier beschriebenen Untersuchungen mit Kälberblut eine geringere Zellausbeute und stärkere Erythrozytenkontamination gefunden werden. Ebenso war eine hohe Anfärbbarkeit der Granulozyten mit Trypanblau sichtbar. Auf einen Erhalt der Phagozytosefähigkeit konnte anhand des ^{14}C Glukosetests geschlossen werden. Es wäre denkbar, daß sich das lange Zentrifugieren schädigend auf die Lebensfähigkeit der Zellen ausgewirkt hat.

Im Gegensatz dazu erweist sich die Isolierung von Granulozyten mittels einer Nylonfasersäule als vorteilhafter. Höhere Zellkonzentrationen pro ml wurden sowohl in der Lymphozyten- als auch Granulozytenfraktion erhalten. Die geringe Anfärbbarkeit der Zellen mit Eosin deutete auf eine gut erhaltene Lebensfähigkeit hin. Ebenso war eine Phagozytosefähigkeit bei den isolierten Zellen nachzuweisen. Eine erythrozytenfreie Lymphozytenfraktion kann nicht gewonnen werden, ebenso wie bei der Methode von RABINOWITZ (1964), wohingegen die Granulozytenfraktion frei von Erythrozyten ist, bei 95 - 100 %iger Reinheit. Die von PRETLOW und LUBEROFF (1973) beschriebene Methode zur Zellisolierung mittels Dichtegradientenzentrifugation erbrachte bei den hier ausgeführten Methoden keine eindeutige Trennung der Lymphozyten- und Granulozytenfraktionen. Reine Lymphozytensuspensionen (85 - 90 %) mit geringer Erythrozytenkontamination konnten mit der Ficoll-

dichte zentrifugation nach HARRIS und UKAEJICFO (1970) schnell erhalten werden. Diese Isolierungsmethode erweist sich für Schweine- und Kälberblut als gleich gut geeignet unter Erhaltung der Lebensfähigkeit der Zellen.

Die Verwendung von Methylzellulose-Isopaque, wie sie von EÖYUM (1968) beschrieben ist, erwies sich nur für eine Leukozytenisolierung brauchbar, jedoch nicht für eine Trennung von Lymphozyten und Granulozyten.

Vergleicht man nun die oben genannten Methoden miteinander, so läßt dies folgende Schlüsse zu: Die Nylonfaser-methode ist den anderen Methoden zur Erhaltung von Granulozytenfraktionen vorzuziehen, da in verhältnismäßig kurzer Zeit und mit wenig Arbeitsaufwand reine Granulozytenfraktionen sowohl aus Schweine- als auch aus Kälberblut mit einem Ergebnis von etwa 90 % Reinheit, gut erhaltener Lebensfähigkeit, Morphologie und Phagozytose-fähigkeit gewonnen werden können. Für eine schnelle Lymphozytenisolierung aus kleinen Blutvolumina ist die Ficoll-dichtegradientenzentrifugation sowohl für Schweine- als auch für Kälberblut die Methode der Wahl.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Folgende Methoden der Trennung der zellulären Bestandteile aus dem Blut von Schwein und Rind werden miteinander verglichen:

1. Flotation mit Jodamid
2. Trennung in einer Nylonfasersäule
3. Trennung in Methylzellulose-Isopaque
4. Zentrifugation in einem Ficoll-Isopaque-Medium
5. Zentrifugation in einem Ficolldichtegradienten

Dabei konnten mit der Nylonfasersäule Lymphozyten- und Granulozytensuspensionen von verhältnismäßig hoher Reinheit aus Schweine- und Kälberblut gewonnen werden.

Für eine Lymphozytenisolierung aus beiden Blutspezies erbringt die Dichtezentrifugation mit Ficoll-Isopaque zufriedenstellende Ergebnisse.

SUMMARY

For the separation of lymphocytes and granulocytes out of the blood of pigs and calves the following methods were used:

1. flotation with Jodamid
2. isolation by means of a Nylon-fiber-column
3. separation in methylcellulose-isopaque
4. centrifugation in a ficoll-isopaque-medium
5. centrifugation in a ficoll-density gradient

It was possible to obtain lymphocyte and granulocyte suspensions of a relatively high purity by using a Nylon-fiber-column.

The density-centrifugation with ficoll-isopaque for isolation of lymphocytes out of both blood-species resulted in satisfactory findings.

F. LITERATURVERZEICHNIS

Abdou, N. und M. Richter 1969

The transfer of antibody-forming capacity to irradiated rabbits by antigen-reactive cells isolated from normal allogenic rabbit bone marrow after passage through antigen-sensitized glass-bead-columns.

J. exp. Med. 130, 141

Abeloff, M., R.J. Mangi, T.G. Pretlow und M. Mardiney 1970

Isolation of leukemic blasts from peripheral blood by density gradient centrifugation.

J. Lab. Clin. Med. 75, 703

Agranoff, B.W., B.L. Vallee und D.F. Waugh 1952

Centrifugal subfractionation of polymorphonuclear leucocytes, lymphocytes and erythrocytes.

Blood, 2, 204

Ahrns, S. und F. Kissmeyer-Nielsen 1968

Lymphocyte suspensions for tissue typing prepared in 15 minutes.

Vox sang. 15, 75

Benett, W. und Z.A. Cohn 1966

The isolation and selected properties of blood monocytes.

J. exp. Med. 123, 145

Bernfield, M.R. und P.E. Fell 1967

Separation of the proliferating and differentiating cell populations of cultured embryonic pancreatic epithelium.

Proc. N. A. S. 58, 2227

Böyum, A. 1964

Separation of white blood cells.

Nature, Lond. 204, 793

Böyum, A. 1968

Isolation of leucocytes.

Scand. J. clin. lab. invest. 21, suppl. 97, 31

Boone, C.W., G.S. Harell und H.E. Bond 1968

The resolution of mixtures of viable mammalian cells into homogenous fractions by zonal centrifugation.

J. Cell. Biol. 36, 369

Brand, L., J. Börjeson, A. Norden und J. Olson 1962

Separation of lymphocytes from peripheral blood by means of a glass wool column.

A method for in vitro culture of lymphocytes.

Acta med. Scan. 172, 459

Buschmann, H. und W. Altstaedten 1973

Messung der Phagozytoseaktivität im Blut von Haustieren.

Zbl. Vet. Med. B. 20, 321

Cassen, E. und J. Hitt und E.F. Hays 1958

The efficient separation of lymphocytes from normal human blood.

J. Lab. Clin. Med. 52, 448

- Christlieb, A.R., A. Sbarra und W.A. Bardawil 1962
Isolation of highly purified, viable leucocytes
from blood.
Am J. Clin. Peth. 37, 257
- Cooper, L. 1968
Ribonucleic acid metabolism in lymphocytes
stimulated by phytohemagglutinin.
J. Biol. Chem 243, 34
- Coulson, A.S. und D.G. Chalmers 1964
Separation of viable lymphocytes from human
blood.
Lancet, 1, 466
- Cudkiewicz, G., M. Benett und G.M. Shearer 1964
Pluripotent stem cell function of the mouse
marrow "lymphocyte".
Science, 144, 866
- Czerki, P., S. Szmigielski und J. Litwin 1966
Simple methods for obtaining purified sus-
pensions of lymphocytes.
Vox. Sang. 11, 734
- Fallon, H.J., E. Frei, J. Davison, J.S. Trier und
O. Burk 1962
Leucocyte preparations from human blood:
evaluation of their morphologic and metabolic
state.
J. Lab. Clin. Med. 59, 779

Fichtelius, K.E. 1951

A simple method to separate lymphocytes from
the blood.

Acta Soc. Med..Uppsala 56, 27

Furth van, R. und Z.A. Cohn 1968

The origin and kinetics of mononuclear
phagocytes.

J. exp. Med. 128, 415

Garvin, J. E. 1961

Factors affecting the adhesiveness of human
leucocytes and platelets in vitro.

J. exp. Med. 114, 51

Greenwalt, T.J., M. Gajewski und J.L. Mc Kenna 1962

A new method of preparing buffy coat-poor
blood.

Transfusion 2, 221

Hallmann, H. 1966

Klinische Chemie und Mikroskopie

Thieme Verlag, Stuttgart

Harris, R. und E.O. Ukaejiofo 1970

Tissue typing using a routine one-step
lymphocyte separation procedure.

Br. J. Haemat. 18, 229

Havemann, K. 1968

Nucleinsäure- und Proteinstoffwechsel in Lympho-
zytenkulturen von Gesunden und Patienten mit Er-
krankungen des lymphatischen Systems.

Z. ges. expl Med. 151, 138

Hulliger, L. und A.A. Blazkovec 1967

A simple and efficient method of separating
peripheral-blood leucocytes for in-vitro studies.
Lancet, 17, 1304

Humphrey, J.R. und R.G. White 1972

Lehrbuch der Immunologie
Stuttgart, Verlag Thieme

Jago, M. 1956

A simple method for the separation of living
lymphocytes from normal human blood.
Br. J. Haemat. 2, 439

Johnson, T.M. und J.E. Garvin 1959

Separation of lymphocytes in human blood by means
of glass wool column.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 102, 1009

Kabat, E.A. 1971

Einführung in die Immunchemie und Immunologie
Berlin, Verlag Springer

Kline, M.J. 1966

Isolation and characterization of RNA from
human leucocytes.
J. Lab. Clin. Med. 68, 33

Lamvik, J.O. 1966

Separation of lymphocytes from human blood.
Acta Haemat. 31, 204

Li, J.G. und E.E. Osgood 1946

A method for the rapid separation of leucocytes and nucleated erythrocytes from blood or marrow with a phytohemagglutinin from red beans.

Blood, 4, 670

Ling, N.R. und P.J. Holt 1967

The activation and reactivation of peripheral lymphocytes in culture.

J. Cell sci. 2, 57

Melen von, J. und P. Unger 1967

Separation of lymphocytes; a comparison of two methods.

J. med. Lab. Techn. 25, 33

Michalak, E. 1968

Separation of lymphocytes from leucocytes from peripheral blood.

Arch. Immunologiae et Therapie exp. 16, 596

Noble, P.B. und J.H. Cutts 1967

Separation of blood leucocytes by Ficoll gradient.

Can. Vet. J. 8, 110

Noble, P.B. und J.H. Cutts 1968

Isolation of individual leucocyte types from peripheral blood.

J. Lab. Clin. Med. 72, 688

Noble, P.E., J.H. Cutts und K.K. Carroll 1968

Ficollflotation for the separation of blood
leucocyte types.

Blood. 31, 66

Otto, F. 1970

Granulozytenisolierung aus dem Blut des
Menschen und der Tiere.

Blut, XXI, 290

Otto, F. und D.C. Schmid 1970

Lymphozytenisolierung aus dem Blut des
Menschen und der Tiere.

Blut, XXI, 118

Oppenheim, J.J., B.G. Leventhal und E.M. Hersh 1968

The transformation of column-purified lympho-
cytes with nonspecific and specific antigenic
stimuli.

J. Immunology 101, 262

Perper, R.J., T.W. Zee und M. Mickelson 1968

Purification of lymphocytes and platelets by
gradient centrifugation.

J. Lab. Clin. Med. 72, 842

Plotz, P.H. und N. Talal 1967

Fractionation of splenic-antibody forming
cells on glass-bead columns.

Immunology 99, 1236

Pretlow, T.G. 1971

Estimation of experimental conditions that permit cell separation by velocity sedimentation on isokinetic gradients of Ficoll in tissue culture medium.

Analyt. Biochem. 41, 248

Pretlow, T.G. und C.W. Boone 1968

Centrifugation of mammalian cells on gradients:

A new rotor.

Science, 161, 911

Pretlow, T.G., C.W. Boone, R. Shrager und G.H. Weiss 1969

Rate zonal centrifugation in a Ficoll gradient.

Analyt. Biochem. 29, 230

Pretlow, T.G. und I.M. Cassady 1970

Separation of mast cells in successive stages of differentiation using programmed gradient sedimentation.

Am. J. Path. 61, 323

Pretlow, T.G. und D.E. Luberoft 1973

An new method for separating lymphocytes and granulocytes from human peripheral blood using programmed gradient sedimentation in a isokinetic gradient.

Immunology 24, 85

Pretlow, T.G., M.E. Pichichero und L. Hyams 1971

Separation of lymphocytes and macrophages from suspensions of guinea-pig peritonitis exudate cells using programmed gradient sedimentation.

Am. J. Path. 61, 323

Pretlow, T.G. and N. Pushparaj 1972

A new method for separating peritoneal lymphocytes from macrophages.

Immunology 22, 87

Rabinowitz, Y. 1964

Separation of lymphocytes, polymorphonuclear leucocytes and monocytes on glass columns including tissue culture observations.

Blood 23, 811

Selerno, A. and G.M. Pontieri 1969

Heterogeneity of populations of antibody-forming cells fractionated by glass-bead columns.

Clin. exp. Immunol. 5, 209

Severson, C.D. and andere 1969

Rapid collection of human leucocytes or lymphocytes from peripheral blood.

Transplantation 8, 535

Shortman, K., N. Williams und P. Adams 1971

The separation of different cell classes from lymphoid organs.

J. Immunol. methods 1, 273

Shortman, K. u. a. 1971

The separation of different cell classes from lymphoid organs.

J. Cell Biol. 48, 566

Skoog, W.A. und W. Beck 1956

Studies on the fi-brinogen, dextran and phyto-hemagglutinin in methods of isolating leucocytes. .

Blood 11, 436

Spriggs, A.J. und R.F. Alexander 1960

An albumin gradient method for separating the different white cells of blood, applied to the concentration of circulating tumour cells.

Nature, Lond. 188, 863

Swenson, M.J. 1970

Dukes Physiology of Domestic Animals

8. Ed.

Comstock publishing Associates a Division of Cornell University Press

Ithaca und London

Terasaki, P.J. und J. Mc Cleveland 1964

Microdroplet assay of human serum cytotoxins.

Nature, Lond. 204, 998

Vaiman, M. v. a. 1970

Evidence for a histocompatibility system in swine (SL-A).

Transplantation 10, 155

Welford, R.L., R. Gallagher und G. Troup 1965

Human lymphocyte typing with isologous antisera; technical considerations and a preliminary study of the cytotoxic reaction system.

Transplantation 3, 387

Wigzell, H. und B. Andersson 1969

Cellseparation on antigen-coated columns;
elimination of high rate antibody-forming
cells and immunological memory cells.

J. exp. Med. 129, 23

Wildy, P. und M. Ridley 1958

Separation of human leucocytes from blood.

Nature, Lond. 182, 1801

Zembala, A.M. 1970

The rapid purification of peritoneal exudate
macrophages by Ficoll density centrifugation.

Immunology 19, 677

Abschließend danke ich Herrn Prof. Dr. dr.h.c. A. Mayr
für die freundliche Überlassung des Themas.

Weiterhin gilt mein Dank Herrn Priv. Doz. Dr. H. Buschmann
für die jederzeit gewährte Unterstützung bei der Durchführung
meiner Arbeit.

Bedanken möchte ich mich auch bei der technischen Assistentin
Frau Albert für ihre immer gern gewährte Hilfsbereitschaft.

LEBENS LAUF

Am 28.6.1946 wurde ich, Maria Schmidt als Tochter des Dr. med. Heinrich Schmidt und seiner Ehefrau Prof. Dr. med. Maria Schmidt, geb. Mittelbach in Gunzenhausen geboren.

Nach 4 Volksschulklassen in Ansbach trat ich 1956 in das Humanistische Gymnasium Ansbach ein, von dem ich 1963 auf das Musische Gymnasium in Neuendettelsau überwechselte, an dem ich 1967 mein Abitur ablegte. Im Wintersemester 1967/68 begann ich an der Tierärztlichen Fakultät der Universität München mit dem Studium der Tiermedizin, das ich im Oktober 1972 mit dem Staatsexamen abschloß. Seit Dezember 1973 bin ich als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch an der Tierärztlichen Fakultät der Universität München tätig.

